

# Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos

Espinosa, C.R.

Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Deleg. Coyoacán, C.P. 04960, México, D.F. Tel. 54837000 ext 3494.

E-mail: [espinosa@correo.xoc.uam.mx](mailto:espinosa@correo.xoc.uam.mx)

## Resumen

**Espinosa, C.R.: *Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos*. Rev. vet. 22: 2, 131-138, 2011.** La placenta de los mamíferos es el órgano mediante el cual los gases respiratorios, nutrientes y desechos se intercambian entre los sistemas maternos y fetales. Por lo tanto, el intercambio transplacentario incluye todas las demandas metabólicas de crecimiento y desarrollo fetal. El desarrollo y la función normal de la placenta son fundamentales para lograr un embarazo exitoso, debido a que el crecimiento fetal normal depende directamente de la transferencia de nutrientes de la madre al feto a través de este órgano. La inhibición de la angiogénesis en el desarrollo de la placenta disminuye su capacidad operativa, lo que lleva finalmente a la restricción del crecimiento fetal. Estudios recientes han demostrado que en las primeras etapas de desarrollo de la placenta, el citotrofoblasto desencadena la vasculogénesis y la angiogénesis; conforme avanza la gestación las células de Hofbauer asumen la tarea de activar el desarrollo de los vasos sanguíneos. Algunos factores de crecimiento importantes en este escenario son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores Tie-1 y Tie-2, así como el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2). Esta revisión se centra en las diferentes etapas de desarrollo durante la placentación en los seres humanos y otros primates, y la posible implicación de factores de crecimiento angiogénico VEGF y angiopoyetina (Ang) en estos procesos, destacando la importancia de las acciones específicas del par de receptores ligando angiogénicos. Elucidar los mecanismos que controlan la placentación normal es importante para la comprensión de la fisiopatología de las condiciones asociadas con el deterioro del desarrollo vascular durante la placentación, como el retraso del crecimiento intrauterino.

**Palabras clave:** angiogénesis, VEGF, placenta, FGF-2, angiopoyetinas.

## Abstract

**Espinosa, C.R.: *Angiogenesis in the placenta of domestic animals*. Rev. vet. 22: 2, 131-138, 2011.** The mammalian placenta is the organ through which respiratory gases, nutrients, and wastes are exchanged between the maternal and fetal systems. Thus, transplacental exchange provides for all the metabolic demands of fetal growth and development. Normal development and function of the placenta is critical to achieving a successful pregnancy, as normal fetal growth depends directly on the transfer of nutrients from mother to fetus via this organ. Suppression of placental angiogenesis results in impoverished development of the placenta, leading ultimately to fetal growth restriction. Recent studies have shown that at the very early stages of placental development, cytotrophoblasts trigger vasculogenesis and angiogenesis, whereas as pregnancy progresses Hofbauer and stromal cells take over the task of triggering blood vessel development. Important growth factors in this scenario are the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors, Tie-1 and Tie-2, as well as the fibroblastic growth factor-2 (FGF-2). This review focuses on the diverse developmental steps during placentation in humans and other primates and the possible involvement of angiogenic growth factors VEGF and angiopoietins (Ang) in these processes, highlighting the importance of specific actions of angiogenic ligand-receptor pairs. Elucidating the mechanisms that control normal placentation is important for understanding the pathophysiology of conditions associated with the impairment of vascular development during placentation such as intrauterine growth retardation.

**Key words:** angiogenesis, VEGF, placenta, FGF-2, angiopoietins.

## INTRODUCCIÓN

Para que la gestación se establezca en una hembra, debe ocurrir la implantación embrionaria, la placentación y la tolerancia inmunológica de la madre para que no haya un rechazo a los antígenos extraños del feto. El desarrollo apropiado de la placenta en los mamíferos es de particular importancia para la síntesis hormonal, las funciones nutritivas, respiratorias y excretoras durante el crecimiento fetal<sup>23,37</sup>. Estas importantes funciones son posibles gracias a la formación de una extensa red vascular desde el endometrio hacia la placenta.

El flujo sanguíneo en la placenta está directamente correlacionado con el crecimiento fetal, sobrevivencia y peso al nacimiento del neonato. El dramático aporte sanguíneo que se demanda en la placenta de todas las hembras de los mamíferos ocurre gracias a dos procesos críticos; la angiogénesis y la vasodilatación<sup>38</sup>.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), así como sus respectivos receptores, son los reguladores clave de la angiogénesis y vasodilatación que ocurren en la placenta. Además se ha propuesto que el aumento intracelular de óxido nítrico (NO) y la consecuente activación de múltiples proteínas cinasas, son fundamentales en la regulación de la síntesis placentaria de ambos factores de crecimiento<sup>44</sup>.

En el desarrollo de este trabajo revisaremos aspectos generales de la placentación en algunas especies, y haremos especial énfasis en los factores angiogénicos que tornan posible el desarrollo vascular en la placenta de algunos mamíferos.

### Placentación en algunas especies

La placenta de los animales puede ser clasificada de acuerdo a la localización del producto dentro del útero, la morfología y la histología. En la Tabla 1 se pueden apreciar las características de la placenta de algunas especies.

### Primates

Desde un punto de vista macroscópico, los primates desarrollan una placenta de tipo discoidal, la cual media la interacción materno-fetal. Dicha interacción tiene lugar en una área de forma circular. Mientras que muchos de los primates no-humanos tienen una placenta bi-discoidal, los humanos desarrollan una placenta mono-discoidal. Por otro lado en la mayoría de los primates, como los monos rhesus, mandriles y el tití, la implantación es superficial porque los blastocistos simplemente se pegan al epitelio uterino y el producto permanece dentro del lumen uterino<sup>19</sup>. Sin embargo, en los grandes primates y en los seres humanos, los blastocistos están completamente embebidos en el endometrio para que la implantación intersticial tenga lugar<sup>19</sup>.

**Tabla. 1.** Tipos de placenta según especies.

especie	tipo de placenta		
	p/posición embrión	por su morfología	por su histología
canino	central	zonal	endoteliochorial (4 capas)
felino	central	zonal	endoteliochorial (4 capas)
equino	central	difusa	epiteliochorial (6 capas)
porcino	central	difusa	epiteliochorial (6 capas)
bovino	central	cotiledónica	epiteliochorial (6 capas)
ovino	central	cotiledónica	epiteliochorial (6 capas)
caprino	central	cotiledónica	epiteliochorial (6 capas)
humano	intersticial	discoidal	hemocorial (3 capas)

La forma más sencilla de interacción materno-fetal encontrada en no-primates es la de trofoblasto plegado. La superficie uterina consta de numerosas ondulaciones. Los pliegues sirven para construir un área o superficie más grande para el intercambio que tiene lugar entre el feto y madre. La interrupción de los pliegues paralelos y la formación de una amplia serie de ramificaciones dan lugar a la hilera de una gran superficie, de forma trabecular y de tipo trofoblástica característica de los primates<sup>22</sup>. La eficacia de este tipo de placentas para el intercambio de nutrientes y oxígeno por volumen de tejido es garantizado por la formación de un árbol formado por repetidas ramificaciones de tallos vellosos de tipo trofoblasto en el cual las vellosidades son convertidas a muchas unidades delgadas. Este tipo de vellosidad de la placenta se encuentra en seres humanos<sup>22</sup> y en monos<sup>33</sup>.

Con respecto al aporte de sangre, en la mayoría de las especies el trofoblasto está simplemente adosado al epitelio uterino sin provocar la destrucción del tejido materno (placentas epiteliochorial y endoteliochorial). Por consiguiente, no existe ningún contacto directo de la sangre materna con el tejido fetal. Cuando la fusión alcanza a erosionar los vasos maternos, para que el trofoblasto se irrigue directamente de la sangre materna, la placentación es llamada hemocorial y es típica de la mayoría de los primates no-humanos y humanos. En este tipo de placenta, la barrera entre la sangre fetal y materna es muy delgada, tornando muy eficiente el intercambio de nutrientes y de oxígeno. El trofoblasto está formado por capilares fetales, tejido intersticial y una monocapa de sincitiotrofoblasto. La profundidad de la invasión trofoblástica y de la remodelación vascular maternal varía entre los primates; la invasión más profunda del trofoblasto con una digestión casi completa de vasos maternos es propia de los seres humanos<sup>54</sup>.

### Animales domésticos

En animales domésticos la interacción entre el trofoectodermo y el epitelio uterino durante el periodo de peri-implantación (implantación no invasiva), es muy poco agresiva si se compara con lo que ocurre en los roedores, carnívoros y primates (implantación invasiva). El contacto íntimo entre trofoectodermo/corion y el útero es mantenido en la cerda y yegua durante la gestación debido a que estas especies tienen una pla-

centación epiteliochorial difusa. El feto en los rumiantes forma células trofoectodérmicas binucleadas que invaden y se unen al útero para formar células multinucleadas o sincitiotrofoblasto y desarrollan una placenta epiteliochorial. Las células binucleadas producen, entre otros elementos, el lactógeno placentario. La unión de las membranas corioalantoideas de la placenta de los rumiantes con las carúnculas uterinas desprovistas de glándulas inducen el desarrollo de los cotiledones en la placenta. La estructura resultante de las carúnculas maternas y los cotiledones placentarios forman el placenta, principal sitio de transferencia de nutrientes y gases<sup>1</sup>.

### Angiogénesis en la placenta

Vasculogénesis y angiogénesis son dos procesos consecutivos para el desarrollo de los vasos sanguíneos en la placenta. Mientras que la vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos, que se originan por la diferenciación de células mesenquimales pluripotenciales provenientes de células progenitoras hemangiogénicas, la angiogénesis se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos de los ya existentes<sup>6</sup>, para lo cual se requiere de la migración de angioblastos<sup>4</sup>, proliferación de células endoteliales, formación de un tubo vascular a partir de otro preexistente, e incremento en la permeabilidad<sup>34</sup>. El citotrofoblasto dispara la vasculogénesis y la angiogénesis; mientras la gestación progresa, las células estromales y de Hofbauer toman la tarea de activar el desarrollo de los vasos sanguíneos<sup>6</sup>.

Es claro entonces que el crecimiento de la placenta y el incremento en el flujo sanguíneo del útero grávido y del cordón umbilical dependen del desarrollo de una apropiada red vascular la cual surge de la angiogénesis<sup>40</sup>. La placenta en la mujer es altamente vascular, al final de la gestación desarrolla una red capilar de aproximadamente 550 km de largo y un área de 15 m<sup>2</sup>, en la oveja en el día 24 de la gestación, la densidad vascular de la mucosa uterina o endometrio crece hasta dos veces más que cuando no está gestante<sup>38</sup>. La densidad vascular del tejido endometrial (placenta materna) continúa incrementándose gradualmente durante la gestación<sup>39</sup>. En contraste, la densidad vascular del tejido placentario permanece relativamente constante hasta la mitad de la gestación para que después de este período se incremente dramáticamente. Este patrón de angiogénesis placentaria coincide con el incremento sustancial que ha sido reportado para el flujo uterino y umbilical durante la gestación<sup>38,40</sup>.

En la gestación normal del ser humano, el crecimiento capilar tiene una propiedad bifásica. Involucra una fase inicial de angiogénesis ramificada, seguida de una fase de angiogénesis no ramificada. Los tubos endoteliales segmentados formados por la vasculogénesis, son transformados en redes capilares primitivas, por la interacción balanceada de dos mecanismos paralelos: elongación de los tubos preexistentes por la angiogénesis no ramificada y la ramificación de estos tubos por la germinación (angiogénesis germinadora).

Se han observado células Tunel positivas en los sitios de elongación de los tubos primitivos y entre ellos, se han identificaron células muertas por apoptosis, lo cual indica que este proceso está involucrado en la apertura de los espacios durante la angiogénesis. Resultados similares se han obtenido en la observación con microscopía electrónica y tinción de hematoxilina-eosina que refuerzan estos eventos<sup>46</sup>.

### Circulación placentaria, crecimiento y desarrollo fetal

En la fertilización *in vitro* y la transferencia embrionaria, la mayor parte de las pérdidas de los productos, ocurre al inicio de la gestación y muy probablemente son debidas al momento crítico que representa la organogénesis embrionaria y la formación de la placenta<sup>9</sup>. La placentación es un proceso dinámico en el cual ocurre un gran número de cambios. Los procesos de diferenciación y desarrollo pueden ser regulados por cambios en la expresión de genes de los factores de crecimiento angiogénico y de sus receptores<sup>54</sup>.

La placentación incluye angiogénesis extensa en los tejidos placentarios maternos y fetales, acompañada por un marcado incremento en el flujo sanguíneo uterino y umbilical. Estos eventos proporcionan un ambiente uterino óptimo al producto en vías de desarrollo para reunir sus demandas metabólicas y probablemente también influenciar la tasa de intercambio fisiológico entre madre y feto durante la gestación. De hecho, la reducción en el desarrollo vascular de la placenta y el aumento en la resistencia vascular han sido asociados con la mortalidad embrionaria temprana. El establecimiento del funcionamiento fetal y la circulación placentaria son algunos de los eventos durante el desarrollo embrión/placenta<sup>39</sup>.

El incremento exponencial del crecimiento fetal durante la última mitad de la gestación, depende principalmente del crecimiento de la vascularización de la placenta, que produce el apropiado flujo sanguíneo uterino y umbilical. Los factores que afectan el crecimiento fetal, como el genotipo materno, el incremento en el número de fetos, la desnutrición materna, la edad materna, el calor medioambiental o el estrés por frío, típicamente tienen efectos similares en el tamaño de la placenta y también están asociados con la reducción en la tasa de oxígeno fetal y consumo de nutrientes y flujo sanguíneo en la placenta. De hecho, se incrementa la resistencia vascular uterina y provoca reducción del flujo sanguíneo uterino, por lo cual los factores que influyen el desarrollo y la función de la placenta, tendrán un impacto considerable en el crecimiento y desarrollo fetal y por consecuencia en la sobrevivencia y crecimiento del neonato<sup>39</sup>.

En la última década, vasculogénesis y angiogénesis han sido revisadas y discutidas en detalle, con énfasis en diferentes aspectos, como los cambios en el perfil molecular de complejos endoteliales durante la gestación, así como cambios en las gestaciones complicadas y su regulación molecular. Sin embargo, faltan muchos

aspectos por conocer con profundidad. Problemas en el desarrollo de los fetos, en la placenta o en ambos, han sido reportados en algunos productos después de la transferencia *in vitro* de embriones de bovino y ovino. En los bovinos estos problemas han incluido la pérdida de la gestación, fetos demasiado grandes o con malformaciones, aumento de hidroalantoides y otras anomalías del desarrollo de la placenta. También se ha observado una inadecuada vascularización de la placenta en embriones de bovinos y ovinos producidos por transferencia nuclear de células somáticas. Se desconoce la razón del aumento de la frecuencia de alteraciones morfológicas y de la angiogénesis placentaria de embriones obtenidos con estas biotecnologías <sup>27</sup>.

Los principales factores que participan en el desarrollo angiogénico de la placenta son: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y las angiopoyetinas (Ang), así como sus respectivos receptores <sup>39</sup>.

### **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

El VEGF es un potente mitógeno y factor de supervivencia para las células endoteliales que han mostrado ser iniciadoras de vasculogénesis y angiogénesis por inducir proliferación, migración y crecimiento de las células endoteliales, así como promover que las células endoteliales den lugar a estructuras en forma de tubo <sup>15</sup>.

Codificado por el cromosoma 6 (6p12), el VEGF es un potente factor angiogénico existente en diferentes partes del cuerpo como el ovario y el cuerpo lúteo <sup>10</sup>, y tiene un papel muy importante en el proceso de implantación. El VEGF es el mayor modulador del crecimiento y remodelación vascular que provoca el incremento de la permeabilidad vascular en el endometrio. La implantación y subsecuente placentación del embrión no son posibles si previamente VEGF no torna receptivo al endometrio para el desarrollo del embrión. Se ha observado que los ratones knock-out para el gen VEGF, pueden concebir pero no producen descendencia viable <sup>20</sup>. La falta del gen de VEGF en estos ratones provoca la muerte al inicio del desarrollo, lo cual indica el importante rol que tiene este factor de crecimiento en la ruta de señalización para el desarrollo vascular <sup>11</sup>.

La familia VEGF tiene varios integrantes: VEGF-A (dominante en el endometrio), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el Factor de crecimiento placentario (PlGF) y cinco principales subtipos de receptores: VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (Kdr, Flk-1), VEGF-R3, así como la forma soluble de Flt-1 (sFlt-1) y Flk-1 (sFlk-1). Tanto VEGF como sus receptores de membrana se expresan en el endometrio, decidua y trofoblasto humano <sup>53</sup>, y en las placentas de oveja y cerda <sup>4</sup>. Los receptores solubles sFlt-1 y sFlk-1, son producidos por el corte y empalme alternativos de los receptores de membrana, los cuales carecen de dominios transmembranales y citoplasmáticos, circunstancia que los hace competitivos por el ligando de VEGF, pero sin actividad biológica <sup>36</sup>. La expresión del VEGF en el endometrio humano

alcanza su máximo durante la implantación. El VEGF-R1 aumenta hacia la primera mitad de la fase secretoria y la expresión del VEGF-R2 alcanza su máximo durante la fase proliferativa <sup>24</sup>.

Expresión y secreción del VEGF son dependientes de condiciones locales como la hipoxia y el estímulo de estrógenos y progesterona, mientras que la expresión de los receptores es dependiente del óxido nítrico y del VEGF <sup>12</sup>. El blastocisto humano es también una fuente de VEGF y produce IL-1 $\beta$ , que activa la producción de VEGF por el embrión y posiblemente por el endometrio, por consiguiente promueve la angiogénesis y vasodilatación (además de la expresión de integrinas) en la implantación. VEGF, es producido en el endometrio cuando éste ha sido invadido por el blastocisto. El VEGF y sus receptores funcionales son expresados por el trofoblasto más notablemente por la invasividad del citotrofoblasto extraveloso durante el primer trimestre de la gestación, sugiriendo que el VEGF participa en la regulación de la proliferación, migración/invasión y actividad metabólica del trofoblasto de una manera autocrina. En la placenta humana, el mRNA del VEGF es expresado en el trofoblasto veloso y los macrófagos maternos <sup>2</sup>. El VEGF y el VEGFR1 soluble también se incrementan en situaciones de enfermedad, como en pacientes con preeclampsia bajo condiciones de hipoxia, sin embargo esto no sucede en condiciones controladas <sup>16</sup>.

Los vellos de la placenta y el trofoblasto extraveloso segregan sFlt-1 durante la gestación y el nivel de sFlt-1 en la circulación materna se incrementa con la edad gestacional. Además, las concentraciones de mRNA de sFlt-1 y la secreción de sFlt-1 se incrementan en medios de cultivo expuestos a bajas concentraciones de oxígeno en explantes velosos de primer tercio de gestación en pacientes sanos y con preeclampsia <sup>36</sup>. La preeclampsia está asociada con un incremento en la circulación total de VEGF, pero disminuye el VEGF libre y el PlGF como resultado del incremento de sFlt-1 <sup>49</sup>. Durante la gestación normal sFlt-1 incrementa sus niveles en suero conforme avanza la gestación, pero es marcadamente superior en suero y placenta durante la preeclampsia. Dichos aumentos en la expresión de proteína de sFlt-1 en los nudos sincitiales, particularmente en la placenta preecláptica, sugieren que el derrame de fragmentos sincitiales puede servir como vehículo para llevar el sFlt-1 a la circulación materna en la función anti-angiogénica de sFlt-1 en la vasculatura materna <sup>31</sup>. Estudios recientes indican que la angiotensina II estimula la secreción y liberación del sFlt-1 en los citotrofoblastos de la placenta <sup>30</sup>. La concentración de VEGF en seres humanos se incrementa durante la gestación, así como también los niveles circulantes de sFlt-1 <sup>28</sup>.

Los animales domésticos desarrollan proteinuria, hipertensión y endoteliosis glomerular como signos de preeclampsia; notablemente, el fenotipo también está presente en animales no gestantes que expresan el sFlt-1. El receptor soluble-2 (sFlk-1), antagoniza

a VEGF, pero no al PlGF. En ratas gestantes no fue suficiente la sobreexpresión de sFlk-1 para desarrollar cambios indicadores de preeclampsia, posiblemente debido a que se requiere el antagonismo hacia ambos VEGF y PlGF para reproducir la enfermedad<sup>26</sup>. Anticuerpos contra VEGF o la proteína sFlt-1 han mostrado ser capaces de inducir daño glomerular y proteinuria en ratonas no gestantes<sup>45</sup>.

En algunos animales de vida silvestre como el mono tití (*Callithrix jacchus*), el VEGF ha sido identificado durante el desarrollo folicular y lúteo; el modelo ha sido establecido por inhibición específica de estos factores angiogénicos *in vivo*<sup>13</sup>. Otros autores han identificado la presencia del mRNA de VEGF en la decidua endometrial, así como sus receptores en las células endoteliales de esta misma región, que incluye los grandes vasos maternos, indicativo de una modulación paracrina similar. Se piensa que la angiopoietina 2 cuando se expresa en conjunción con el VEGF puede ser pro-angiogénica estimulando la desestabilización de los vasos, el rompimiento de la lámina basal y permitiendo la migración de las células endoteliales y por consecuencia la angiogénesis. Esto indica que a las 4 semanas de la gestación, el VEGF y la angiopoietina 2 trabajan sinérgicamente para promover la migración de estos vasos y establecer una eficiente interfase para el intercambio de nutrientes y oxígeno en la circulación materno-fetal<sup>41</sup>.

En el caso de los mustélidos, el incremento de la expresión de los receptores de VEGF parece estar asociado con la implantación. En el mink, la expresión de Flk-1 en el útero de animales pseudogestantes es baja en comparación con los animales gestantes. Además, las muestras uterinas derivadas de los sitios de implantación mostraron alta expresión de Flt-1, relativo al útero de animales en diapausa o pseudogestación<sup>25</sup>. En la coneja, ambos receptores para VEGF, estuvieron presentes en el útero en diferentes estados, con altos niveles durante el estro y justo antes de la implantación<sup>5</sup>. En el hámster, la expresión de los receptores fue también correlacionada con el avance de la implantación embrionaria<sup>55</sup>.

En muestras de cerda<sup>51</sup> y oveja<sup>52</sup>, no fue posible detectar algún factor que ligue VEGF, lo que indirectamente sugiere una falta de sFlt-1 en muestras sanguíneas de estas especies, lo cual puede deberse a las inherentes diferencias en los tipos de placentación (*i.e.* epiteliochorial modificada en la oveja, epiteliochorial en la cerda y hemocorial en el ser humano). El sFlt-1 es muy importante en la circulación humana para controlar el VEGF en el sistema materno. Sin embargo, en el caso de la oveja, la actividad de VEGF se determinó por radioinmunoensayo y se observó que dicho factor no logra ingresar a la circulación materna debido al incremento en el número de capas celulares entre el flujo sanguíneo materno-fetal. Los resultados de este estudio sugieren que la oveja no es un buen modelo para detectar VEGF en la circulación materna debido a los diferentes tipos de placentación<sup>52</sup>.

Sin embargo, en otro estudio en cerdas sí se ha identificado que VEGF es producido en la placenta, así como presencia de células blanco en estos mismos tejidos, mediante elementos radiactivos como el I<sup>125</sup>. Esta técnica demuestra la presencia de sitios de unión de VEGF en los capilares fetales y maternos de la placenta de la cerda. La información también indica que VEGF actúa de forma paracrina al igual que en el tití y puede llevar a cabo una o varias funciones. Por ejemplo, VEGF estimula el crecimiento y atrae los capilares a la superficie epitelial; esto puede estimular el continuo crecimiento de vasos sanguíneos durante la gestación, incrementando la superficie de área y por consiguiente, la capacidad de intercambio de la placenta; y ello puede estar involucrado en la estimulación o regulación de la permeabilidad de las células endoteliales. Además, los experimentos de unión al ligando indican que los sitios de unión para VEGF son limitados para las células endoteliales<sup>3</sup>.

Otro estudio más reciente en la cerda, demostró que el sistema completo receptores-VEGF no es expresado en el *conceptus* durante el periodo peri-implantación; sin embargo la expresión del gen sVEGFR-1 en el endometrio y cuerpo lúteo es altamente regulado durante el inicio de la gestación. Los resultados sugieren que el VEGF<sub>164</sub> derivado del *conceptus* puede tener un papel importante en los eventos vasculares alrededor de la implantación en la cerda. El patrón de expresión de VEGFRs indirectamente juega un papel para VEGFR-1 en el propio crecimiento y desarrollo del *conceptus* durante el inicio de la gestación. Además, la gestación induce la presencia del gen para sVEGFR-1 sugiriendo que ésta puede participar en la remodelación vascular alrededor de la implantación<sup>21</sup>.

En la vaca, mediante radioinmunoensayo se determinó un incremento de la concentración de VEGF en sangre durante la gestación y se observó que tiene una correlación positiva con el peso del becerro al nacimiento<sup>50</sup>. Las isoformas predominantes por las cuales la expresión del mRNA fueron detectadas en la placenta bovina fueron: VEGF<sub>120</sub>, VEGF<sub>164</sub> y VEGF<sub>188</sub><sup>27</sup>. Los efectos genéticos y ambientales en el desarrollo fetal y el peso al nacimiento de los becerros son dependientes de la angiogénesis y vasculogénesis para establecer el sistema vascular materno-fetal y apoyar la función útero-placenta y el desarrollo del *conceptus*. En el caso de gestaciones dobles en bovinos la concentración de VEGF es muy importante debido a que está asociada con el incremento útero-placenta y el desarrollo del *conceptus* y el aumento de los requerimientos nutricionales por los gemelos<sup>8</sup>. Éste podría ser un mecanismo de compensación de una inadecuada angiogénesis y placentación, durante el primer trimestre de embarazo.

Las implicaciones clínicas del sistema VEGF-VEGF-receptor en la reproducción asistida aún no son claras; sin embargo en la fertilización *in vitro* la expresión del VEGF en muestras de endometrio (en un ciclo espontáneo de 4-6 días después de la ovulación) sugiere ser discriminativo entre gestantes y no-gestantes. Se

han observado altas concentraciones en suero de VEGF el día de recuperación del ovocito en un ciclo de fertilización *in vitro* el cual fue predictivo de un embarazo subsecuente<sup>7</sup>. Ello podría abrir las posibilidades para que sea considerado un marcador de implantación. Otra observación importante para los clínicos es que la estimulación con gonadotropinas, reduce las concentraciones de VEGF y la implantación en ratones<sup>42</sup> y el tratamiento con FSH recombinante en humanos reduce las concentraciones de VEGF en suero<sup>7</sup>. Es necesario realizar más investigaciones para elucidar el proceso de angiogénesis en la placentación e implantación, así como refinar las posibilidades diagnósticas del VEGF como un marcador para la angiogénesis<sup>20</sup>.

### Factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2)

Los FGFs constituyen una familia de factores de crecimiento polipeptídicos altamente conservados, con una alta afinidad por la heparina y los proteoglicanos. Varias isoformas de FGF participan en el desarrollo y la angiogénesis de la placenta, aunque la isoforma más importante y mejor caracterizada en este proceso es FGF-2, también conocida como factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Estudios *in vitro*, han confirmado que el trofoblasto produce FGF-2<sup>18-32</sup>. Este factor ejerce su acción a través de receptores tipo tirosina cinasa y por corte y empalme alternativo se pueden producir cinco receptores distintos FGFR 1-5<sup>43</sup>.

Los tejidos fetales y maternos expresan FGF-2 a lo largo de la gestación<sup>44</sup>, lo que indica que es un factor esencial para la diferenciación de los tejidos vasculares y no vasculares derivados del mesodermo<sup>39</sup>. En la placenta de bovino, bFGF se ha localizado en el citoplasma de células epiteliales, en el estroma materno y fetal, así como en células endoteliales<sup>35</sup>. Durante la angiogénesis y vasculogénesis, existe un entrecruzamiento entre las actividades de FGF y diferentes miembros de la familia de VEGF, por lo cual se ha llegado a pensar que FGF-2 induce neovascularización indirectamente por activación del sistema VEGF/ VEGFR<sup>14-47</sup>.

### Angiopoyetinas

Las angiopoyetinas son una familia de factores de crecimiento en la que están incluidas Ang-1 y Ang-2<sup>48</sup>. Los receptores de las angiopoyetinas, Tie-1 y Tie-2 están expresados casi exclusivamente en células endoteliales. Tie-2 une a ambas angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2. Si Ang-1 se une a Tie-2 promueve el mantenimiento y la estabilización de vasos sanguíneos maduros, mediante la interacción entre células endoteliales, los pericitos y la membrana basal. Por otra parte, si se une Ang-2 a Tie-2, promueve la desestabilización de los vasos sanguíneos e inicia la neovascularización. Estos vasos desestabilizados son sometidos a una regresión en ausencia de VEGF, pero cuando esta citocina angiogénica está presente como en el caso de la inflamación, los vasos desestabilizados sufren cambios angiogénicos y forman nuevos vasos sanguíneos<sup>29</sup>. Los factores de crecimiento VEGF, sus receptores y la familia de las

angiopoyetinas están involucrados en la iniciación de la angiogénesis en la placenta de los mamíferos durante la gestación. En la oveja se ha identificado la expresión del RNAm para angiopoyetinas y su receptor TEK (receptor tirosina cinasa) que se incrementa al inicio de la gestación; estos datos indican que la angiogénesis endometrial se manifiesta por el aumento de la vascularidad y el incremento de la expresión de los diversos factores involucrados en la regulación de la angiogénesis al inicio de la gestación<sup>17</sup>.

### CONCLUSIÓN

La participación de los factores angiogénicos en la placenta de los primates indica la relación entre las dos grandes familias con efectos angiogénicos, el VEGF y las angiopoyetinas. Ello sugiere que VEGF / Flt y Ang-1/Tie-2 ligando del receptor están involucrados en la invasión y el desarrollo del trofoblasto. VEGF / KDR y Ang-1/Tie-2 ligando del receptor pueden controlar la diferenciación vascular fetoplacentaria. El desarrollo y la estabilización de Ang-2/Tie-2 ligandos del receptor pueden ser esenciales para la remodelación de la vasculatura materna. Además, la expresión de sFlt sugiere que el desarrollo vascular exitoso durante la placentación se encuentra regulado y depende de factores angiogénicos y de sus antagonistas endógenos. La identificación de factores relacionados con la placentación en los mamíferos puede ser de utilidad terapéutica para restaurar o prevenir la función vascular de la placenta normal.

### REFERENCIAS

1. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138: 195-209.
2. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. 2000. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 21: 203-209.
3. Charnock-Jones DS, Clark DE, Licence D, Day K, Wooding FB, Smith SK. 2001. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction*: 122, 753-760.
4. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I: molecular regulation. *Placenta* 25: 103-113.
5. Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH. 1997. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 56: 1390-1399.
6. Demir R, Sevala Y, Huppertz B. 2007. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 109: 257-265.
7. Dorn C, Reinsberg J, Kupka M, van der Ven H, Schild RL. 2003. Leptin, VEGF, IGF-1, anti IGFBP-3 concentra-

- tions in serum and follicular fluid of women undergoing *in vitro* fertilization. *Arch Gynecol Obstetr* 26S: 187-193.
8. **Echternkamp SE, Vonnahme KA, Green JA, Ford SP.** 2006. Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses. *J Anim Sci* 84: 2057-2064.
  9. **Eckert JJ, Houghton FD, Hawkhead JA, Balen AH, Leese HJ, Picton HM, Cameron IT, Fleming TP.** 2007. Human embryos developing *in vitro* are susceptible to impaired epithelial junction biogenesis correlating with abnormal metabolic activity. *Hum Reprod* 22: 2214-2224.
  10. **Espinosa CR, Rosado GA.** 2002. Angiogénesis en la fisiología reproductiva. Desarrollo folicular, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. *Ginecol Obstetr Mex* 70: 17-27.
  11. **Ferguson JE, Kelley RW, Patterson C.** 2005. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2246-2254.
  12. **Ferrara N.** 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25: 581-611.
  13. **Fraser HM, Lunn SF.** 2001. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 121: 355-362.
  14. **Gabler C, Plath-Gabler A, Killian GJ, Berisha B, Schams D.** 2004. Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. *Reprod Domest Anim* 39: 321-327.
  15. **Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB.** 2002. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and non-branching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor- $\alpha$ , angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocr Metab* 87: 4213-4224.
  16. **Gould PS, Gu M, Liao J, Ahmad S, Cudmore MJ, Ahmed H, Vatish M.** 2010. Upregulation of urotensin II receptor in preeclampsia causes *in vitro* placental release of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in hypoxia. *Hypertension* 56: 172-178.
  17. **Grazul-Bilska AT, Borowicz PP, Johnson ML, Minten MA, Bilski JJ, Wroblewski R, Redmer DA, Reynolds LP.** 2010. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction* 140: 165-174.
  18. **Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y.** 1998. Evidence for basic fibroblast growth factor as a crucial angiogenic growth factor, released from human trophoblasts during early gestation. *Placenta* 19: 149-155.
  19. **Hearn JP.** 1986. The embryo-maternal dialogue during early pregnancy in primates. *J Reprod Fertil* 76: 809-819.
  20. **Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG.** 2004. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 9: 692-715.
  21. **Kaczmarek MM, Kiewisz J, Schams D, Ziecik AJ.** 2009. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology* 71: 1298-1306.
  22. **Kaufmann P, Burton G.** 1994. Anatomy and genesis of the placenta. In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil E, Neill JD, Ed.), 2nd ed, Raven Press, New York, p 441-484.
  23. **Khaled M, Elsayes KM, Trout AT, Friedkin AM, Liu PS, Bude RO, Platt JF, Menias CO.** 2009. Imaging of the placenta: a multimodality pictorial review. *RadioGraphics* 29: 1371-1391.
  24. **Krüssel JS, Behr B, Milki AA, Hirschhain J, Wen Y, Bielfeld P, Polan M.** 2001. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 7: 57-63.
  25. **Lopes FL, Desmarais J, Gévry NY, Ledoux S, Murphy BD.** 2003. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and Kdr during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* 68: 1926-1933.
  26. **Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE.** 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111: 649-658.
  27. **Miles JR, Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Farin PW.** 2004. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod* 71: 1919-1926.
  28. **Molskness TA, Stouffer RL, Burry KA, Gorrill MJ, Lee DM, Patton PE.** 2004. Circulating levels of free and total vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, soluble VEGF receptors-1 and -2, and angiogenin during ovarian stimulation in non-human primates and women. *Hum Reprod* 19: 822-830.
  29. **Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis, CE.** 2007. Expression of tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 178: 7405-7411.
  30. **Muthig V, Gilsbach, R, Haubold M, Philipp M, Ivacevic T, Gessler M, Hein L.** 2007. Upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 contributes to angiogenesis defects in the placenta of 2b-adrenoceptor-deficient mice. *Circ Res* 101: 682-691.
  31. **Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I.** 2006. Increased expression of sFlt-1 in *in vivo* and *in vitro* models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1085-R1093.
  32. **Ornitz DM, Itoh N.** 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: reviews 3005.1-3005.12.
  33. **Palmer AE, London WT, Sly DL, Rice JM.** 1979. Spontaneous preeclamptic toxemia of pregnancy in the pata monkey (*Erythorchebus patas*). *Lab Anim Sci* 29: 102-106.
  34. **Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F.** 1996. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 122: 1363-1371.
  35. **Pfarrer CD, Weise S, Berisha B, Schams D, Leiser R, Hoffmann B, Schuler G.** 2006. Fibroblast growth factor

- (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF receptors are uniformly expressed in trophoblast giant cells during restricted trophoblast invasion in cows. *Placenta* 27: 758-770.
36. **Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT.** 2010. Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Update* 16: 415-431.
  37. **Redmer DA, Aitken RP, Milne JS, Reynolds LP, Wallace JM.** 2005. Influence of maternal nutrition on messenger RNA expression of placental angiogenic factors and their receptors at mid gestation in adolescent sheep. *Biol Reprod* 72: 1004-1009.
  38. **Reynolds LP, Redmer DA.** 1995. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 73: 1839-1851.
  39. **Reynolds LP, Redmer DA.** 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 64: 1033-1040.
  40. **Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Caton JS.** 2005. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol* 565: 43-58.
  41. **Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM.** 2003. Research localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 126: 227-238.
  42. **Sibug RM, Helmerhorst FM, Tijssen AM, Tijssen ER, Kloet ER, de Koning J.** 2002. Gonadotrophin stimulation reduces VEGFp expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Hum Reprod* 17: 1643-1648.
  43. **Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, Murison JG.** 2001. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene* 271: 171-182.
  44. **Song Y, Wang K, Chen D, Magness RR, Zheng J.** 2009. Suppression of protein phosphatase 2 differentially modulates vegf- and fgf2-induced signaling in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Placenta* 30: 907-913.
  45. **Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R.** 2003. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (vegf) by anti-vegf antibodies and soluble vegf receptor 1 (sflt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* 278: 12605-12608.
  46. **Tertemiz F, Kayisli UA, Arici A, Demir R.** 2005. Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol Reprod* 72: 727-735.
  47. **Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, Schnell C, Ferrari S, Mestan J.** 2001. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 1073-1085.
  48. **Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ.** 2007. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet* 24: 303-315.
  49. **Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM.** 2003. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5555-5563.
  50. **Vonnahme KA, Ford SP.** 2002. Increases in circulating levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) during the second trimester of gestation are correlated with calf birth weight in beef heifers. *Proceed Am Soc Anim Sci* 53: 23-25.
  51. **Vonnahme KA, Ford SP.** 2004. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J Physiol* 554: 194-201.
  52. **Vonnahme KA, Wilson ME, Li Y, Rupnow HL, Phernetton TM, Ford SP, Magness RR.** 2005. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *J Physiol* 565: 101-109.
  53. **Wulff C, Wilson H, Dickson S, Wiegand SJ, Fraser HM.** 2002. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 66: 802-812.
  54. **Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM.** 2003. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 126: 569-577.
  55. **Yi XJ, Jiang HY, Lee, KK, O WS, Tang PL, Chow PH.** 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell Tissue Res* 296: 339-349.